

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 108–115

Automatische und manuelle Hydroxyprolinbestimmung im Urin – Vergleich von drei Methoden

Von H. Burkhardt, Frauke Burkhardt, R. Wepler und K. Rommel

Aus dem Department Klinische Chemie der Universität Ulm

(Eingegangen am 6. August/22. November 1973)

Eine manuelle und eine mechanisierte Hydroxyprolinbestimmungsmethode werden mit der manuellen Referenzmethode verglichen und auf ihre Brauchbarkeit im klinisch-chemischen Routinelabor überprüft. Beide Methoden erweisen sich als ausreichend spezifisch und für das Routinelabor geeignet. Normalbereich und Vertrauensbereich für die Hydroxyprolinausscheidung sowie die Schwankungsbreite der Ausscheidung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen werden ermittelt.

Automatic and manual determinations of hydroxyproline in urine. A Comparison of three methods

A manual and a mechanized method for the determination of hydroxyproline were compared with the manual reference method, and tested for their suitability for use in the routine clinical chemical laboratory.

Both methods were sufficiently specific and suitable for the routine laboratory. The normal range and confidence limits for hydroxyproline excretion, and the range of variation of the excretion for two consecutive days are reported.

Die Hydroxyprolinkonzentration eines Gewebes ist proportional seinem Kollagengehalt (1). Die Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin ist ein zuverlässiger Parameter des Kollagenstoffwechsels (2, 3).

Da verschiedene Erkrankungen mit einer Beteiligung des Kollagens mit einer veränderten Hydroxyprolinausscheidung im Urin einhergehen, ist die Messung der Hydroxyprolinausscheidung in der Diagnostik folgender Erkrankungen verwendbar:

- Knochenmetastasen maligner Tumoren (4, 5),
- Schilddrüsenerkrankungen (6, 7, 8),
- Wachstumsstörungen (9, 10),
- Hyperparathyreoidismus (11, 12)

Für eine routinemäßige Anwendung waren die bisher zur Verfügung stehenden Methoden (13–15) jedoch zu kompliziert und zeitlich zu aufwendig. Es sind jetzt zwei Verfahren bekannt, die einfacher und schneller durchführbar sind.

Grant (16) modifizierte für die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes in Geweben eine Methode von Stegemann (17), so daß sie mit dem AutoAnalyzer durchgeführt werden kann.

Goverde und Veenkamp (18) entwickelten eine Methode zur Hydroxyprolinbestimmung im Urin, die ohne aufwendige Hilfsmittel durchzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit beider Verfahren als klinisch-chemische Routinemethoden untersucht.

Dazu wurden die Präzision und die Spezifität der Methoden bestimmt, die untere „Nachweisgrenze“ ermittelt sowie Wiederfindungs- und Aufstockungsversuche durchgeführt. Es wurden der „Normalbereich“

und der Vertrauensbereich der Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin berechnet, sowie die Schwankungen der Ausscheidung von Tag zu Tag. Ferner wurde die Haltbarkeit der hydroxyprolinhaltigen Peptide im Urin bei -18°C geprüft.

Material und Methoden

Die untersuchten Proben wurden 24-Stunden-Urinen entnommen, die zur Untersuchung des Hydroxyprolingehaltes gesammelt worden waren. Die Untersuchung erstreckte sich über einen Zeitraum von zwei Jahren. 24 Stunden vor und während der Sammelperiode erhielten die Probanden eine hydroxyprolinfreie Diät ohne Fleisch, Wurst, Fisch, Fleischbrühen und ohne Nahrungsmittel mit Gelatinezusätzen.

Das Urinsammelgefäß enthielt 10 ml Toluol. Die Vollständigkeit der Sammlung wurde durch die Messung der Kreatininausscheidung geprüft. Das Einhalten der hydroxyprolinfreien Kost wurde mit der Bestimmung der Ausscheidung der freien Aminosäure Hydroxyprolin kontrolliert.

Referenzmethode

Die Methode von Kivirikko et. al. (15) diente als Referenzmethode.

Autoanalyzermethode

Hydroxyprolin wurde mit dem AutoAnalyzer nach der von Grant (16) angegebenen Methode bestimmt, bei der es sich um die auf den AutoAnalyzer adaptierte Methode von Stegemann (17) handelt. Der Nachweis beruht auf der Oxidation des Hydroxyprolins mit Chloramin-T und anschließender Reaktion des dabei entstehenden Pyrrols mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd. Überschüssiges Chloramin-T wird durch Perchlorsäure zerstört. Die Farbentwicklung wird bei 550 nm gemessen. Vor der Hydroxyprolinbestimmung mit dem AutoAnalyzer wurden die hydrolysierten Urine mit einem Gemisch aus Norit A und Amberlite vorbehandelt. Mit diesem von Prockop und Udenfriend (14) beschriebenen Verfahren wurden die Reaktion störende Chromogene entfernt.

Reagenzien und Lösungen

Alle Reagenzien sind, wenn nicht anders vermerkt, p. a.-Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt.

1. Puffer

50 g Citronensäure, 34 g Natriumhydroxid, 120 g Natriumacetat krist. und 12 ml Essigsäure min 96% werden mit ca. 900 ml demineralisiertem Wasser gelöst, auf pH 6,0 eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Aufbewahrung im Kühlschrank.

2. 4-Dimethylaminobenzaldehydlösung 0,33 mol/l

50 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden mit Propanol(1) gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung muß klar sein und darf nur eine schwach gelbe Farbe zeigen. Aufbewahrung im Kühlschrank.

3. Perchlorsäure 1,9 mol/l

270 ml Perchlorsäure etwa 70% (D etwa 1,67) werden mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

4. Chloramin T-Lösung 12,5 mmol/l

1,41 g Chloramin T werden in 80 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Dazu werden 120 ml Äthylenglycolmonomethyläther und 200 ml Puffer gegeben. Die Lösung muß täglich frisch angesetzt werden.

5. Eich-Stammlösung 0,76 mmol/l

10,0 mg L-Hydroxyprolin werden in 90 ml demineralisiertem Wasser gelöst, mit Salzsäure auf pH 3 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Aufbewahrung im Kühlschrank.

Aus dieser Stammlösung werden durch Verdünnung mit Wasser täglich neue Arbeitslösungen hergestellt mit den Konzentrationen 3,82, 7,63, 15,3, 30,5, 38,2, 61,1 und 76,3 $\mu\text{mol/l}$.

6. Norit A-Amberlite-Gemisch

20 g Amerlite CG-400 I (100–200 mesh, p. A., Gegenion Chlor)¹⁾ werden mit 10 g Norit A pract.¹⁾ gemischt, auf einer Fritte mehrmals mit HCl 6 mol/l gewaschen und anschließend mit einem Gemisch aus Äthanol und Äther (6:1) getrocknet.

Geräte

Zur Hydrolyse des Urins wurde ein Heizblock (Typ 51402) der Firma Braun (Melsungen) verwandt. Die Temperatur wird über einen Thermostaten konstant gehalten. Die Messungen der Hydroxyprolinkonzentration erfolgten auf einem Einkanal-AutoAnalyzer der Fa. Technicon, Bad Vilbel.

Hydrolyse

Nach Zusatz von 2 ml HCl, etwa 10 mol/l zu 2 ml Urin werden die Proben 12 Stunden bei 115°C im Heizblock hydrolysiert. Danach werden 2 ml Wasser hinzugegeben, sowie etwa 1 g des Norit-Amberlite Gemisches. Nach kräftigem Schütteln und Zentrifugieren werden 3 ml des klaren Überstandes in ein 15 ml-Röhrchen pipettiert, mit Natronlauge auf pH 8 eingestellt und auf 15 ml aufgefüllt.

Meßbedingungen

Die so vorbereiteten Proben wurden mit dem AutoAnalyzer bei einer Frequenz von 40 Proben pro Stunde gemessen. Da zur Zwischenspülung jeder Probe ein Gefäß mit demineralisiertem Wasser nachfolgte, ließen sich pro Stunde 20 Messungen durchführen. Die Auswertung der graphisch ausgegebenen Analogsignale erfolgte anhand einer Eichkurve über den Bereich 3,82–76,3 $\mu\text{mol/l}$ Hydroxyprolin. Die Linearität der Messung wurde durch Auftragen der Transmissionswerte in logarithmischem Maßstab gegen die Konzentrationswerte in linearem Maßstab überprüft. Dabei zeigte sich, daß das Lambert-Beer'sche

Gesetz bis zur Konzentration 76,3 $\mu\text{mol/l}$ gilt. Es wurden jedoch Proben mit einer Konzentration über 61,1 $\mu\text{mol/l}$ 4:1 mit demineralisiertem Wasser verdünnt und dann erneut gemessen, da ab dieser Konzentration die Eichkurve vom geradlinigen Verlauf abwich.

Das verwendete Fließdiagramm ist in Abbildung 1 dargestellt.

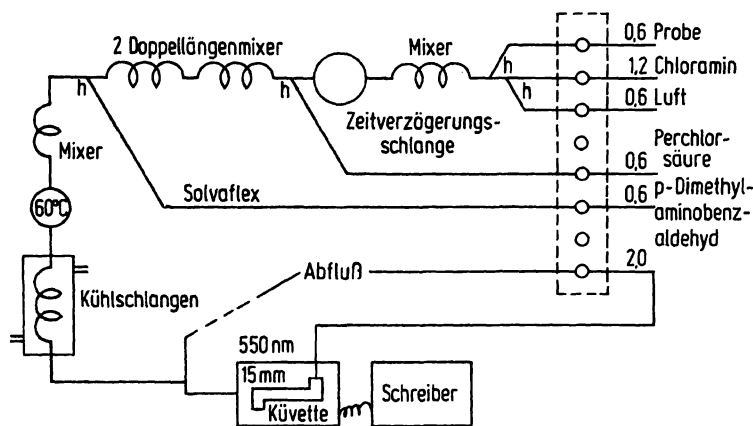


Abb. 1. Fließdiagramm für den Autoanalyzer h = DI

Durch Multiplikation der Meßergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor und der Urinmenge, sowie Division durch den Wert der Körperoberfläche in m^2 und den Faktor 1000 wurde die Hydroxyprolinausscheidung in $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche berechnet.

Hyponosticontest²⁾

Dieser Test wurde nach der von Goverde und Veenkamp (18) angegebenen Methode durchgeführt. Abweichend von der Arbeitsvorschrift erfolgte die Hydrolyse im Heizblock bei 115°C über 16 Stunden.

Reagenzien und Lösungen

1. Ionenaustauscherharz, „Amberlite“ CG 120 II, 200–400 mesh, H-Form, Tabletten aus je 250 mg Harz mit Zusatz von Binde- und Füllsubstanzen.
2. Wäßrige Hydroxyprolinstandardlösung 381 $\mu\text{mol/l}$, sterilisiert und in Ampullen abgefüllt. Unbegrenzte Haltbarkeit bei Raumtemperatur.
3. Oxidationslösung aus 1375 mg Chloramin-T, gelöst in 100 ml 0,35 mol/l Acetat-0,1 mol/l Citratpuffer pH 6. Der Puffer enthält 30,8% Propanol- (2). Frischer Ansatz vor jeder Untersuchung.
4. Farbreagenz. 24 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 36 ml etwa 60% Perchlorsäure aufgelöst und mit Propanol- (2) auf 330 ml aufgefüllt. Haltbarkeit wenige Stunden.

Sämtliche Reagenzien sind zu einer Testkombination zusammengestellt. Mit Ausnahme des Amberlite sind es p. a.-Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt.

Hilfsreagenzien: NaOH, 2 mol/l
HCl, 2 mol/l
Propanol- (2)
1 proz. Phenolphthaleinlösung

Geräte

1. Zur Hydrolyse ein Heizblock mit Thermostat (Typ 51402, Fa. Braun/Melsungen).
2. Die Hydrolysierröhrchen (10 × 100 mm) mit Eichmarkierungen bei 2,5 und 10 ml haben einen Schraubverschluß mit zusätzlichem Gummistopfen. Die Röhrchen werden von der Herstellerfirma der Testkombination (Fa. Organon Teknika, München) mitgeliefert.

¹⁾ Firma Serva, Heidelberg

²⁾ Fa. Organon Teknika, München

Durchführung

Für die Doppelbestimmung eines Urins werden fünf Röhrchen mit U₁, U₂ (Urinproben), S₁, S₂ (Urinproben mit innerem Standard) und L (Leerwert) bezeichnet. In jedes Röhrchen werden gegeben

1 Tablette Austauscherharz

0,5 ml Urin (mit Ausnahme des Leerwertes).

Zusätzlich werden in die Röhrchen S₁ und S₂ je 1 ml Hydroxyprolinstandardlösung pipettiert. Sämtliche Röhrchen werden bis zur Markierung 10 ml mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt, geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Hydrolyse erfolgt bei 115°C über Nacht in den verschlossenen Röhrchen. Nach dem Abkühlen wird ein Tropfen Phenolphthalein hinzugefügt und mit NaOH 1 mol/l bis zum Umschlagpunkt titriert. Die Röhrchen werden mit demineralisiertem Wasser bis zur Marke 2,5 ml aufgefüllt, geschüttelt, zentrifugiert und je 0,5 ml des Überstandes in entsprechend bezeichnete Reagenzgläser pipettiert sowie 1 Tropfen HCl 2 mol/l zugegeben, so daß die Rotfärbung des Indikators verschwindet. Es werden zu jeder Probe 1,0 ml Propanol- (2) und 0,5 ml Farbreagenz hinzugefügt sowie nach vier Minuten bei Raumtemperatur 10 ml Farbreagenz. Nach 25 Minuten bei 60°C im Wasserbad und 30 Minuten Abkühlen bei Raumtemperatur wird die Extinktion gegen den Leerwert bei 546 nm gemessen.

Auswertung

Berechnung der Hydroxyprolinkonzentration K:

$$K_1 = \frac{2E_U \cdot 50}{E_{S1} \cdot E_{U1}} \quad K_2 = \frac{2E_U \cdot 50}{E_{S2} \cdot E_{U2}}$$

E_U = Extinktion der Probe in dem mit U bezeichneten Röhrchen

E_S = Extinktion der Probe in dem mit S bezeichneten Röhrchen

Bildung des Mittelwertes aus K₁ und K₂.

Durch Multiplikation des Mittelwertes mit der 24-Stunden-Urinmenge und Division durch die Körperoberfläche und den Faktor 1000 wird die Hydroxyprolinausscheidung in µmol/d · m² Körperoberfläche berechnet.

Zuverlässigkeitskriterien für beide Methoden

Methode nach Grant (16)

Versuchsanordnungen

1. Präzision in der Serie
10 Proben des gleichen Urins wurden hydrolysiert und ihre Hydroxyprolinkonzentration mit dem AutoAnalyzer bestimmt.
2. Präzision von Tag zu Tag
32 Proben eines Urins wurden abgefüllt und bei -18°C eingefroren. An 32 Arbeitstagen wurde je eine Probe aufgetaut und ihre Hydroxyprolinkonzentration als Doppelbestimmung mit dem AutoAnalyzer gemessen.
3. Spezifität
Zur Beurteilung der Spezifität der AutoAnalyzermethode wurde die Methode von Kivirikko et al. (15) als Referenzmethode verwandt. Dazu wurde der Hydroxyprolingehalt von 80 24-Stunden-Urinen gleichzeitig mit beiden Methoden bestimmt. Die Werte der zu prüfenden Methode wurden gegen die entsprechenden Werte der Referenzmethode aufgetragen und die Regressionsgerade sowie der Korrelationskoeffizient ermittelt. Als weiteres Kriterium der Spezifität wurde ein Berechnungsverfahren von Stamm (19) angewendet.
4. Nachweisgrenze
Es wurden mehrere Hydroxyprolin-Standardlösungen, beginnend bei 0,76 µmol/l, gemessen.

- 5.1. Aus einer 153 µmol/l Hydroxyprolin-Standardlösung wurden 6 Proben auf pH 8 eingestellt und die Konzentrationen mit dem AutoAnalyzer gemessen.
- 5.2. Aus einer 153 µmol/l Hydroxyprolin-Standardlösung wurden 8 Proben mit je 2 ml HCl 10 mol/l wie oben beschrieben hydrolysiert und mit dem AutoAnalyzer die Konzentrationen bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mit dem unter 5.1. ermittelten Durchschnittswert verglichen.
- 5.3. Aus einem Urin wurde 6 mal die Hydroxyprolin-Konzentration mit dem AutoAnalyzer wie oben beschrieben bestimmt.
- 5.4. Je 1 ml des unter 5.3. verwandten Urins wurde mit je 1 ml einer Hydroxyprolin-Standardlösung 153 µmol/l gemischt und aus 8 verschiedenen Ansätzen der Hydroxyprolingehalt mit dem AutoAnalyzer wie oben beschrieben bestimmt. Das Ergebnis wurde mit dem zu erwartenden Wert verglichen, der unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsfaktoren aus dem unter 5.2. und 5.3. berechneten Durchschnittsergebnissen ermittelt wurde.

Ergebnisse

1. Präzision in der Serie (Tab. 1)

Die mittlere Hydroxyprolinkonzentration (\bar{x}) betrug 235 µmol/l mit einer Standardabweichung (s) von 7,6 µmol/l. Aus diesen Werten wurde ein Variationskoeffizient von 3,2% berechnet.

Tab. 1. Die Präzision in der Serie der Hydroxyprolinbestimmung im Urin mit dem Autoanalyzer. 10 Proben des gleichen Urins.
(\bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient)

Nr.	Hydroxyprolinkonzentration µmol/l
1	240
2	240
3	223
4	240
5	229
6	240
7	240
8	243
9	234
10	223

$$\bar{x} = 235 \text{ µmol/l}$$

$$s = 7,6 \text{ µmol/l}$$

$$VK = 3,2 \%$$

2. Präzision von Tag zu Tag (Tab. 2)

Die mittlere Hydroxyprolinkonzentration der an 32 Tagen bestimmten Hydroxyprolinkonzentrationen des gleichen Urins betrug 207 µmol/l mit einer Standardabweichung von 16,5 µmol/l. Der Variationskoeffizient war 7,9%.

3. Spezifität (Abb. 2)

Beim Auftragen der 80 Meßwerte vom Autoanalyzer gegen die 80 Meßwerte der Referenzmethode ergab sich eine Regressionsgerade von $y = 0,85x + 15,6$ und ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,936$. Der Korrelationskoeffizient ist jedoch nach Stamm (19) nur ein Linearitätsmaß, das sich für einen Spezifitätsvergleich zweier Methoden nur beschränkt eignet,

Tab. 2. Die Präzision der Hydroxyprolinbestimmung im Urin von Tag zu Tag. 32 Proben des gleichen Urins wurden an aufeinanderfolgenden Arbeitstagen untersucht (\bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient)

Bestimmungs-Nr.	Hydroxyprolin-Konzentration $\mu\text{mol/l}$	Bestimmungs-Nr.	Hydroxyprolin-Konzentration $\mu\text{mol/l}$
1	195	17	214
2	208	18	218
3	202	19	208
4	195	20	221
5	189	21	214
6	182	22	214
7	182	23	247
8	192	24	214
9	182	25	195
10	195	26	208
11	195	27	221
12	192	28	227
13	227	29	202
14	227	30	227
15	182	31	221
16	214	32	221

\bar{x} = 207 $\mu\text{mol/l}$
 s = 16,5 $\mu\text{mol/l}$
 VK = 7,9 %

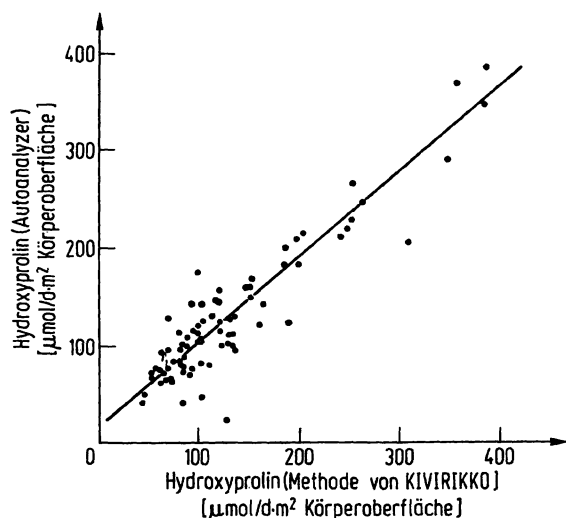


Abb. 2. Gleichzeitige Bestimmung der Hydroxyprolintagesausscheidung mit dem Autoanalyzer und der Referenzmethode (15). $r = 0,936$, $y = 0,85x + 15,6$.

denn Werte für r zwischen 0,80 und 0,95 können sowohl aus einer guten, aber nicht linearen Beziehung resultieren als auch aus einer linearen Beziehung bei großer Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade. Zu entscheiden war hier, ob der Korrelationskoeffizient von 0,93 durch eine mangelnde Spezifität der AutoAnalyzermethode bedingt ist oder ob die Werte nur stärker um die Regressionsgerade streuen, d. h. durch zufällige Fehler bedingt ist. In letzterem Falle dürfte die Streuung der Differenzen der mit beiden Methoden erhaltenen Meßwerte (\bar{s}) nicht größer sein als die aus der statistischen Qualitätskontrolle ermittelte mittlere Streuung ($\sqrt{s_2}$) beider Methoden (19).

\bar{s} errechnet sich nach der Formel

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum (x_j^{(i)} - x_j^{(r)})^2}$$

wobei $x_j^{(i)}$ für den mit der untersuchten Methode i gewonnenen Meßwert j und $x_j^{(r)}$ für den mit der Referenzmethode gewonnenen Meßwert j steht.

Für die Berechnung der mittleren Streuung beider Methoden gilt:

$$\sqrt{s_2} = \sqrt{\frac{1}{2} (s^2(e^{(i)}) + s^2(e^{(r)}))}$$

wobei als Schätzwert für $s(e^{(i)})$ und $s(e^{(r)})$ die Streuung von Tag zu Tag der AutoAnalyzermethode i und der Referenzmethode r eingesetzt wurde. Die Streuung der Differenzen s war mit 16,9 $\mu\text{mol/l}$ kleiner als die mittlere Streuung beider Methoden $\sqrt{s_2}$ mit 21,8 $\mu\text{mol/l}$. Daraus folgt, daß die Spezifität der untersuchten Methode gut ist und der Korrelationskoeffizient von 0,93 durch zufällige Meßfehler bedingt ist.

4. Untere Nachweisgrenze

Die niedrigste Hydroxyprolinkonzentration, die mit dem AutoAnalyzer erfaßt wird, ist 3,82 $\mu\text{mol/l}$.

5. Wiederfindungs- und Aufstockungsversuche (Tab. 3–6)

5.1. Der Mittelwert aus 6 Messungen der Hydroxyprolinkonzentration einer Standardlösung von 153 $\mu\text{mol/l}$ ist 151 $\mu\text{mol/l}$, mit einer mittleren Standardabweichung von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 3).

5.2. Der Mittelwert aus 8 Messungen der Hydroxyprolinkonzentration einer Standardlösung von 153 $\mu\text{mol/l}$, bei denen die Proben „hydrolysiert“ und wie eine Urinprobe behandelt wurden, ist 143 $\mu\text{mol/l}$ mit einer mittleren Standardabweichung von 1,5 $\mu\text{mol/l}$. Im Vergleich zu dem erwartenden Wert von 150 $\mu\text{mol/l}$ betrug die durchschnittliche Wiederfindungsrate 95,2% (Tab. 4).

5.3. Der Mittelwert aus 6 Messungen der Hydroxyprolinkonzentration eines Urins ist 155 $\mu\text{mol/l}$ mit einer mittleren Standardabweichung von 4,0 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 5).

5.4. 8 Proben desselben Urins wie bei 5.3. wurde das gleiche Volumen einer Hydroxyprolin-Standardlösung 153 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt und die Hydroxyprolinkonzentration auf dem AutoAnalyzer gemessen. Der Mittelwert war 113 $\mu\text{mol/l}$ mit einer mittleren Standardabweichung von 0,9 $\mu\text{mol/l}$. Der erwartete Hydroxyprolinwert unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsfaktoren war 113 $\mu\text{mol/l}$. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 100% (Tab. 6).

Tab. 3. Hydroxyprolinkonzentrationen einer 6mal mit dem AutoAnalyzer untersuchten 153 $\mu\text{mol/l}$ -Hydroxyprolinstandardlösung
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $s_{\bar{x}}$ = mittlere Standardabweichung)

	Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$
1	149
2	149
3	156
4	151
5	149
6	149

n = 6
 \bar{x} = 151
 s = 2,8
 $s_{\bar{x}}$ = 1,1

Tab. 4. Die Hydroxyprolinkonzentration einer 8mal mit dem Autoanalyzer nach Hydrolyse bestimmten 153 $\mu\text{mol/l}$ Hydroxyprolinstandardlösung. Die gemessenen Werte wurden mit dem erwarteten Wert (s. o.) verglichen
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $s_{\bar{x}}$ = mittlere Standardabweichung)

	Gemessene Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$	Durchschnittliche erwartete Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$	% des erwarteten Wertes %
1	149	150	99
2	137	150	91
3	142	150	95
4	140	150	93
5	142	150	95
6	149	150	99
7	142	150	95
8	142	150	95

n = 8
 \bar{x} = 143
 s = 4,2
 $s_{\bar{x}}$ = 1,5

Tab. 5. Die Hydroxyprolinkonzentrationen eines Urins 6mal mit dem Autoanalyzer bestimmt.
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $s_{\bar{x}}$ = mittlere Standardabweichung)

	Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$
1	168
2	149
3	149
4	149
5	168
6	149

n = 6
 \bar{x} = 155
 s = 9,8
 $s_{\bar{x}}$ = 4,0

Tab. 6. Die Hydroxyprolinkonzentration des unter Tabelle 5 verwandten Urins mit einer 153 $\mu\text{mol/l}$ Hydroxyprolinstandardlösung im Verhältnis 1:1 gemischt und mit dem Autoanalyzer acht Mal bestimmt.
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $s_{\bar{x}}$ = mittlere Standardabweichung)

	Gemessene Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$	Durchschnittliche erwartete Hydroxyprolinkonzentration $\mu\text{mol/l}$	% des erwarteten Wertes %
1	117	113	108
2	114	113	101
3	109	113	96
4	114	113	101
5	110	113	97
6	114	113	101
7	114	113	101
8	114	113	101

n = 8
 \bar{x} = 113
 s = 2,5
 $s_{\bar{x}}$ = 0,9

Hypronosticontest

Versuchsanordnungen

1. Die Untersuchung der Präzision in der Serie
Die Hydroxyprolinkonzentration eines Urins wurde zu Beginn der Untersuchung 14mal mit dem Hypronosticontest bestimmt. Ein anderer Urin wurde nach Einarbeitung in die Methode in der gleichen Weise 7mal untersucht. Bestimmt wurden die Variationskoeffizienten der Hydroxyprolinkonzentrationen.
2. Die Untersuchung der Spezifität
Die Hydroxyprolinkonzentrationen von 45 Sammelurinen wurden gleichzeitig mit der Methode von Grant (16) als Referenzmethode und mit dem Hypronosticontest bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Ergebnisse

1. Die Präzision in der Serie (Tab. 7 und 8)
Bei den 14 Bestimmungen der Hydroxyprolinkonzentrationen des ersten Urins zu Beginn der Untersuchung wurde ein Mittelwert von 190 $\mu\text{mol/l}$ und eine Standardabweichung von 23,3 $\mu\text{mol/l}$ gefunden. Der Variationskoeffizient war 12,3%.
Aus den 7 Bestimmungen des anderen Urins nach Einarbeitung in die Methode wurde eine mittlere Hydroxyprolinkonzentration von 145 $\mu\text{mol/l}$ bei einer Standardabweichung von 4,6 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Der Variationskoeffizient war 3,2%.
2. Spezifität (Abb. 3)
Die bei den 45 Urinen mit dem AutoAnalyzer als Referenzmethode gemessenen Hydroxyprolinkonzentrationen lagen zwischen 58,0 und 2320 $\mu\text{mol/l}$. Die untersuchte Methode zeigte beim Vergleich mit der Referenzmethode eine gute Übereinstimmung, der Korrelationskoeffizient war 0,98.

Tab. 7. Die Hydroxyprolinkonzentrationen eines 14mal mit dem Hypronosticon-Test untersuchten Urins.
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient)

Hydroxyprolinkonzentration der Probe $\mu\text{mol/l}$	
218	
187	
217	
208	
187	
184	
173	
163	
208	
182	
155	
233	
179	
166	

n = 14
 \bar{x} = 190
 s = 23,3
 VK = 12,3 %

Tab. 8. Die Hydroxyprolinkonzentration eines Urins 7mal mit dem Hypronosticon-Test untersucht.
(n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient)

Hydroxyprolinkonzentration der Probe $\mu\text{mol/l}$	
145	
145	
145	
145	
137	
153	
145	

n = 7
 \bar{x} = 145
 s = 4,6
 VK = 3,2

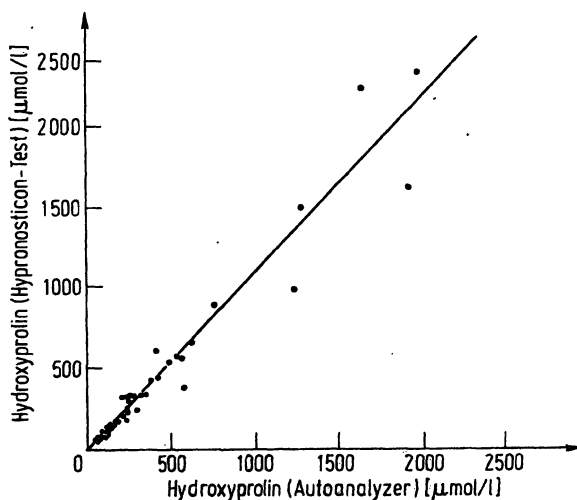


Abb. 3. Gleichzeitige Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration mit dem Hypronosticon-Test und dem Autoanalyzer $r = 0,984$.

Auffallend ist, daß die Korrelation bei Werten über $916 \mu\text{mol/l}$ abnimmt.

Der Normalwert und Vertrauensbereich, sowie die Schwankungen der Hydroxyprolinausscheidung von Tag zu Tag und die Haltbarkeit der Hydroxyprolinhaltigen Peptide im Urin

Versuchsanordnungen

Normalwert und Vertrauensbereich

Die Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin von 78 stoffwechselgesunden, männlichen und weiblichen Personen im Alter zwischen 18 und 75 Jahren wurde mit dem AutoAnalyzer gemessen. Um altersbedingte Unterschiede der Hydroxyprolinausscheidung zu erfassen, wurden die Probanden in Altersklassen von 18–25, 26–35, 36–45, 46–55, 56–65 und 66–75 Jahre eingeteilt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurden errechnet und untereinander verglichen. Zur Ermittlung des Normalwertes wurden der Mittelwert und die 2 s-Grenzen berechnet. Zur Festlegung des Vertrauensbereiches wurde darüberhinaus nach *Stamm* (20) der zufällige Fehler berücksichtigt nach der folgenden Formel:

$$\left[\bar{x} - \frac{\lambda}{\sqrt{n}} \sigma\right] < \mu < \left[\bar{x} + \frac{\lambda}{\sqrt{n}} \sigma\right]$$

\bar{x} = Analysenergebnis

σ = Präzision von Tag zu Tag

n = Anzahl der Einzelbestimmungen

λ = Faktor für Vertrauensgrenze (Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ ist $\lambda = 1,96$)

Die Schwankungen der Hydroxyprolinausscheidung von Tag zu Tag

Zur Berechnung der Schwankungen der Hydroxyprolinausscheidung von Tag zu Tag wurde bei 68 Probanden mit normaler und erhöhter Hydroxyprolinausscheidung im Urin an 2 aufeinanderfolgenden Tagen die Hydroxyprolinausscheidung im Urin gemessen. Die Differenzen der Werte beider Tage wurden ermittelt und der Durchschnittswert berechnet.

Die Haltbarkeit der hydroxyprolinhaltigen Peptide des Urins bei Lagerung

Eine größere Anzahl Proben des gleichen Urins wurde bei -18°C eingefroren. Im Abstand von 2 Wochen wurde jeweils 1 Probe aufgetaut, hydrolysiert und ihr Hydroxyprolingehalt mit dem AutoAnalyzer gemessen.

Ergebnisse

Normalwerte und Vertrauensbereich

Die Mittelwerte der Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin der einzelnen Altersklassen wurden in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Die Altersgruppe von 18–25 Jahre wies mit $196 \mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche einen deutlich höheren Mittelwert auf als die übrigen Altersklassen. Die Altersgruppen zwischen 26 und 75 Jahren zeigten untereinander kaum Unterschiede. Der Mittelwert lag bei $113 \mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche. Da es sich um normalverteilte Meßwerte handelte, wurde bei einer Standardabweichung von $s = 38,1 \mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche nach *Büttner et al.* (21) für eine Wahrscheinlichkeit von 95% ein Normalbereich von $36,6–190 \mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche ermittelt.

Tab. 9. Die Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin bei stoffwechselgesunden Probanden verschiedener Altersklassen in $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche.

Alter (Jahre)	18–25	26–35	36–45	46–55	56–65	66–75	26–75
n	7	21	15	13	11	11	71
Hydroxyprolinausscheidung in $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche							
\bar{x}	196	125	103	124	104	102	113
s	57,2	39,7	25,9	49,6	23,7	39,7	38,1
$s_{\bar{x}}$	21,3	8,4	6,9	13,7	6,9	12,2	4,6

Unter Berücksichtigung des zufälligen Fehlers wurde nach der oben angegebenen Formel (20) ein Vertrauensbereich von 22,9 bis 203 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche berechnet.

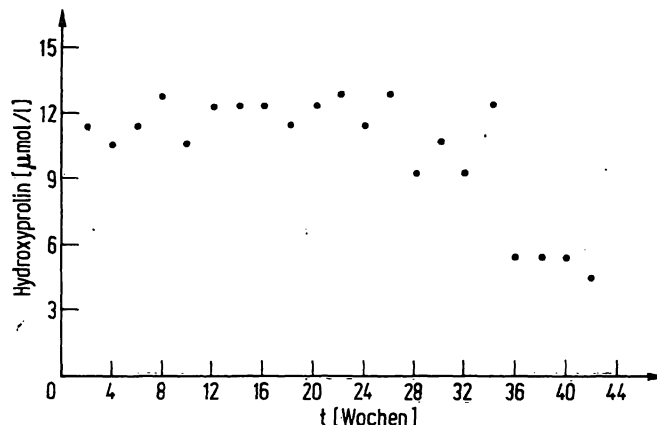
Die Schwankung der Hydroxyprolinausscheidung von Tag zu Tag (Tab. 10)

Die Unterschiede der Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin an 2 aufeinanderfolgenden Tagen waren abhängig von der Höhe der Hydroxyprolinausscheidung. Bei Werten bis zu 152 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche waren die Mittelwerte an beiden Tagen mit 102 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche gleich. Die aus den Differenzen der Einzelwerte berechnete prozentuale Abweichung des Wertes am 2. Tag von dem des 1. Tages ergab einen Wert von 11,7%.

Bei Probanden mit einer Hydroxyprolinausscheidung zwischen 153 und 304 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche betrug der Mittelwert am 1. Tag 205 und am 2. Tag 205 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche.

Tab. 10. Die durchschnittliche Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin und mittlere Differenz der Werte beider Tage in % vom Wert des 1. Tages ohne Berücksichtigung des Vorzeichens bei 68 Probanden nach der Höhe der Hydroxyprolinausscheidung in 3 Gruppen eingeteilt.

Bereich der Höhe der Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche	Anzahl der Probanden	Hydroxyprolinausscheidung $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche		Mittlere Differenz in % des Wertes vom ersten Tag %
		1. Tag	2. Tag	
0–152	42	\bar{x}	102	102
		s	25,1	27,4
		$s_{\bar{x}}$	3,8	3,8
153–304	20	\bar{x}	205	205
		s	36,6	58,8
		$s_{\bar{x}}$	7,6	13,0
über 305	6	\bar{x}	508	582
		s	223	557
		$s_{\bar{x}}$	90,8	227
zusammen (0–305)	68	\bar{x}	168	175
		s	134	131
		$s_{\bar{x}}$	16,0	25,2

Abb. 4. Die Veränderung der Hydroxyprolinkonzentration eines eingefrorenen Urins (-18°C) über 42 Wochen, im Abstand von 2 Wochen bestimmt.

Aus den Differenzen der Werte beider Tage wurde eine Abweichung von 14,8% ermittelt, und bei einer Hydroxyprolinausscheidung von über 305 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche betrugen die Mittelwerte am 1. Tag und 2. Tag 508 bzw. 582 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche und die durchschnittliche Abweichung 15,0% (Tab. 10).

Bei der Zusammenfassung der Werte aller 68 Probanden ergaben sich am 1. und 2. Tag Mittelwerte von 168 bzw. 175 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche. Die mittlere Differenz der Werte beider Tage betrug 12,9%, bezogen auf den ersten Tag (Tab. 10).

Die Haltbarkeit der hydroxyprolinhaltigen Peptide bei Lagerung (Abb. 4)

Bis zu 28 Wochen nach dem Einfrieren blieb die Hydroxyprolinkonzentration des Urins konstant. Danach fielen die gemessenen Werte deutlich ab. Urinproben können somit bis zu 7 Monaten bei -18°C ohne Abnahme der Hydroxyprolin-Konzentration gelagert werden.

Diskussion

Zwei Verfahren zur Hydroxyprolinbestimmung im Urin wurden auf ihre Anwendbarkeit in der klinisch-chemischen Routinediagnostik überprüft. Die von Grant (16) beschriebene AutoAnalyzer-Methode wurde für die Hydroxyprolinbestimmung in Geweben entwickelt. Sie

ist wegen des Vorhandenseins störender Chromogene nicht direkt für Bestimmungen im Urin anwendbar. Führt man jedoch zwischen der Hydrolyse und der Bestimmung einen Schritt zur Entfernung der Chromogene (14) mit Ionenaustauschern und Aktivkohle ein, so lassen sich mit dieser Methode eine gute Präzision in der Serie und von Tag zu Tag erzielen sowie eine gute Wiederfindung und eine befriedigende Spezifität, verglichen mit der Referenzmethode (15). Eine technische Assistentin kann mühelos 20 Proben pro Stunde messen.

Der Hypronosticontest zeigte, verglichen mit der Auto-Analyzermethode, eine gute Präzision in der Serie und eine sehr hohe Spezifität. Er ist mit der Standardausrüstung eines Labors einfach durchzuführen.

Die Untersuchung der Hydroxyprolin-Tagesausscheidung mit dem AutoAnalyzer zeigte bei 18–25jährigen Probanden einen signifikant höheren Mittelwert als bei allen darüber liegenden Altersklassen. Wegen der geringen Fallzahl haben wir auf die Berechnung des Normal- und Vertrauensbereiches verzichtet. Bei Probanden zwischen 25 und 75 Jahren fanden wir keine altersbedingten Unterschiede in der Ausscheidung. Der Vertrauensbereich war unter Berücksichtigung des methodischen Fehlers 22,9–205 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche.

Die Schwankung der Hydroxyprolinausscheidung von Tag zu Tag beim gleichen Patienten ist abhängig von der Höhe der Hydroxyprolinausscheidung. Die mittlere Differenz als Prozentwert der Ausscheidung des ersten Tages betrug in der Gruppe bis zu 152 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche 11,7% und bis 305 $\mu\text{mol/d} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche 14,8% und bei Werten darüber 15,0%. Daraus leiten wir die Empfehlung ab, bei einer Hydroxyprolinausscheidung zwischen 183 und 229 $\mu\text{mol/l} \cdot \text{m}^2$ Körperoberfläche die Untersuchung zu wiederholen. Für eine nicht sofortige Aufarbeitung einer Urinprobe und zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag können abgefüllte und bis -20°C eingefrorene Urinproben bis zu 7 Monaten verwahrt werden. Danach wird ein deutlicher Abfall der Hydroxyprolinkonzentration beobachtet. Man kann jedoch zur Qualitätskontrolle einen lyophilisierten Kontrollurin³⁾ verwenden, der im Handel erhältlich ist.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

³⁾ Q-PAK-Chemistry Urine Control, Fa. Hyland.

Literatur

1. Neumann, R. E. & Logan, M. A. (1950), *J. Biol. Chem.* 186, 549–554.
2. Meilman, E. M., Urivetzky, M. & Rapoport, D. M. (1963), *J. Clin. Invest.* 42, 40–48.
3. Prockop, D. J., Keiser, H. R. & Sjoerdsma, A. (1962), *Lancet* II, 527–531.
4. Platt, W. D., Doolittle, L. H. & Hartshorn, J. W. S. (1964), *N. Engl. J. Med.* 271, 287–291.
5. Burkhardt, H., Rommel, K., Endres, O. & Anyanwu, G. (1969), *Schweiz. Med. Wochenschr.* 99, 327–330.
6. Kivirikko, K. I., Laitinen, O. & Lamberg, B. A. (1965), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 1347–1351.
7. Rommel, K., Fourie, L., Böhm, W., Adam, W. E. & Beneke, G. (1968), *Med. Klinik* 63, 410–413.
8. Burkhardt, H., Rommel, K., Karstens, R. & Böhm, W. (1969), *Med. Welt* 20, 2520–2522.
9. Jasin, H. E., Fink, C. W., Wise, W. & Ziff, M. (1962), *J. Clin. Invest.* 41, 1928–1933.
10. Teller, W., Genscher, U., Burkhardt, H. & Rommel, K. (1973), *Arch. Dis. Childhood* 48, 127–132.
11. Klein, L., Albertsen, K., Curtiss, K. & Curtiss jr., P. H. (1962), *Metabolism* 11, 1023–1028.
12. Horwith, M. J., Buchanan, R., Gudmunsson, S. T. & Mautalen, C. A. (1966), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 885–892.
13. Woessner, J. F. (1961), *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440–448.
14. Prockop, D. J. & Udenfriend, S. (1960), *Anal. Biochem.* 1, 228–232.
15. Kivirikko, K. I., Laitinen, O. & Prockop, D. J. (1967), *Anal. Biochem.* 19, 249–255.
16. Grant, R. A. (1964), *J. Clin. Path.* 17, 685–686.
17. Stegemann, H. (1958), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 311, 41–45.
18. Goverde, B. C. & Veenkamp, F. J. N. (1972), *Clin. Chim. Acta* 41, 29–40.
19. Stamm, D. (1973), in *Optimierung der Diagnostik* (Lang, H., Rick, W., Roka, L., Hrsg.) S. 187–201, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
20. Stamm, D. (1970), in *Auftrag der Klinik an das klinisch-chemische Laboratorium* (Lang, H., Rick, W., Hrsg.) S. 23–34, Schattauer Verlag, Stuttgart–New York.
21. Büttner, H., Hansert, E. & Stamm, D. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 1, S. 356, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

Prof. Dr. K. Rommel
79 Ulm
Steinhövelstraße 9